

2012 年度修士論文要旨

ヘテロ環有機ビスマス化合物によるリソソーム崩壊誘導を介したアポトーシス機構の解明

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 矢倉研究室 高田知宏

我々はこれまでの研究でヘテロ環有機ビスマス化合物の一種、bi-chlorodibenzo [c,d] [1,5] thiabismocine (#3)が高い抗菌活性、様々な種類のがん細胞に対する細胞増殖阻害効果を持つこと、特に急性前骨髄球性白血病(APL)細胞株である NB4 細胞に対して高い抗腫瘍効果を持つことを明らかにしている。そのメカニズムの一つとして、ミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)低下を経由したアポトーシスや細胞周期停止が、我々の研究によって証明されているが、細胞死メカニズムは完全に明らかでない。

本研究は、 $\Delta\Psi_m$ 低下やアポトーシスと関係があると考えられるリソソームに着目し、リソソーム崩壊を介したアポトーシス経路の検証、またその上流にあるリソソーム崩壊のメカニズムを解明することを目的として行った。

WST-8 assay と濃度・時間依存的なアポトーシス率測定の結果、処理濃度 0.5 μM 以下、処理時間 6 時間の条件で、穏やかにアポトーシスを誘導し、最もリソソーム崩壊を観察に相当だと判断した。定めた条件でのアポトーシス率測定、リソソーム安定性解析、 $\Delta\Psi_m$ 解析の結果アポトーシス率が顕著に上昇を開始する時間(#3 処理後 4 時間)より早い時間(#3 処理後 2 時間)から顕著にリソソーム崩壊率、 $\Delta\Psi_m$ 低下率が上昇することが明らかとなった。カテプシン阻害剤を用いたアポトーシス率測定、Bid、Brm タンパクのウェスタンブロット解析、リソソーム安定性、 $\Delta\Psi_m$ 解析を行った結果、カテプシンのアポトーシス、リソソーム崩壊、 $\Delta\Psi_m$ 低下、Bid の切断への関与は存在せず、またカテプシン G による Brm の切断が示唆された。カスパーゼ阻害剤を用いたリソソーム安定性、 $\Delta\Psi_m$ 解析と Bid タンパクのウェスタンブロット解析の結果、リソソーム崩壊率・ $\Delta\Psi_m$ 低下率の増加、Bid の切断がカテプシン非依存的、カスパーゼ依存的であることが明らかとなった。スカベンジャーを用いたリソソーム安定性、 $\Delta\Psi_m$ 解析の結果、リソソーム崩壊率、 $\Delta\Psi_m$ 低下率が顕著に上昇を開始する時間(#3 処理後 2 時間)より早い時間(#3 処理後 1 時間)から顕著に ROS 発生が上昇すること、リソソーム崩壊が ROS 依存的であることが明らかとなった。ミトコンドリア由来の ROS スカベンジャーであるロテノン(rotenone : Rot)・鉄キレート剤であるデフェロキサミン(deferoxamine : DFO)を用いたリソソーム安定性、 $\Delta\Psi_m$ 解析の結果、リソソーム崩壊が ROS によるリソソーム内鉄のフェントン反応($\text{Cys-S}^\cdot - \text{Fe}^{2+} - \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Cys-SH} - \text{Fe}^{3+}$)によるものであることが明らかとなった。透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope : TEM)による形態学的な観察の結果、#3 は NB4 細胞に対してアポトーシスだけでなく、オートファジーも誘導することが示唆された。オートファゴソーム特異的プローブであるモノダンシルカダベリン(monodansylcadaverine : MDC)を用いたオートファゴソーム形成の検証の結果、#3 は NB4 細胞に対してカスパーゼ非依存的なオートファジーを誘導することが明らかとなった。

以上の結果より#3 が誘導するアポトーシスでは、処理後 1 時間より ROS の発生、2 時間よりリソソーム内鉄のフェントン反応とリソソーム崩壊・ $\Delta\Psi_m$ 低下、4 時間より核断片化などのアポ

トーシス現象の順に起こっていること、また、カスパーゼ依存的なアポトーシスとは別に、カスパーゼ非依存的なオートファジックアポトーシスも同時に誘導していることが明らかとなった。この研究成果は有機ビスマス化合物の生理作用に関する新しい知見であり、抗がん剤の創出に寄与出来るものと考えている。